

说明书

F2-RNA pull-down 试剂盒

货号

FI8701-12T

描述

F2-RNA pull-down 试剂盒，包含足够完成 12 个反应的试剂，每个反应用 40 μ L 磁珠。由于每次 pull-down 需要设置实验组和对照组，因此本试剂盒可以完成 6 次 pull-down 实验。

试剂盒组分

编号	名称	体积（12 Tests）	储存条件
①	磁珠	500 μ L	4 $^{\circ}$ C，1 年
②	裂解缓冲液	7 mL	4 $^{\circ}$ C，1 年
③	NT2 缓冲液	26 mL	4 $^{\circ}$ C，1 年
④	RNA 结构缓冲液	650 μ L	4 $^{\circ}$ C，1 年
⑤	漂洗液	32 mL	4 $^{\circ}$ C，1 年
⑥	洗脱缓冲液	650 μ L	-20 $^{\circ}$ C，1 年
⑦	蛋白酶抑制剂	230 μ L	-20 $^{\circ}$ C，1 年
⑧	RNase 抑制剂	65 μ L	-20 $^{\circ}$ C，1 年
⑨	F2 配体	250 μ L	-20 $^{\circ}$ C，1 年
⑩	10 mL 离心管	——	——

目录

I 产品简介	2
II 重要产品信息	2
III 额外所需的主要材料和仪器	2
IV 实验前准备工作	2
V 操作方法	3
VI 问题解决	5
VII 使用案例	6

I 产品简介

辉骏生物自主研发的 F2-RNA pull-down 试剂盒利用 F2 标签与其特异性配体的强亲和力高效调取目标 RNA 及其结合蛋白。F2 标签是一段短 RNA 序列，与目标 RNA 连接后，几乎不影响其结构和功能，可以用于体内或体外标记各种类型的 RNA（如 mRNA、lncRNA、circRNA 等）。

II 重要产品信息

- 请勿干燥或冷冻磁珠，这些操作会导致磁珠聚集而降低结合能力。
- 由于煮沸会导致磁珠聚集并且失去结合能力，经煮沸的磁珠不应再次使用。
- 裂解缓冲液可兼容 BCA 蛋白定量。
- 本试剂盒可以用于体内或体外 RNA pull-down 实验，请根据实验要求选择相应的操作方法。

III 额外所需的主要材料和仪器

- **自备材料：**T7 体外转录试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒（体外 F2-RNA pull-down）、RNA-F2 过表达细胞（体内 F2-RNA pull-down）、PBS、RNase-free 水。
- **所需仪器：**低温离心机、混匀仪、磁力架、超声仪（动物组织、植物和微生物样本裂解需要）。

IV 实验前准备工作

F2-RNA 制备

方案 1：体外 F2-RNA pull-down——RNA 探针制备

- (1) 根据目标 RNA 序列设计带有 T7 启动子 (TAATACGACTCACTATAGGG) 和 F2 标签序列 (GGCGCTGACAAAGCGCC) 的引物，以目标序列的 DNA 质粒为模板，PCR 分别获得 T7-正义 RNA-F2 (实验组) 和 T7-反义 RNA-F2 (对照组) 转录模板，按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书回收目标 DNA。

引物名称	引物序列
正义链-正引物 (带 T7 启动子)	5'- TAATACGACTCACTATAGGG+目标 RNA 头部序列 -3'
正义链-反引物 (带 F2 标签)	5'- GGCGCTTTGTCAGCGCC+目标 RNA 尾部序列的反向互作序列 -3'
反义链-正引物 (带 F2 标签)	5'- GGCGCTTTGTCAGCGCC+目标 RNA 头部序列 -3'
反义链-反引物 (带 T7 启动子)	5'- TAATACGACTCACTATAGGG+目标 RNA 尾部序列的反向互作序列 -3'

- (2) 以上述 DNA 为模板，按照自备的 RNA 体外转录试剂盒说明书配置反应体系，以下为示例（该体系和步骤可能因转录试剂盒的不同而有所差别，请务必根据试剂盒说明书操作）：

组分	用量
10*Reaction Buffer	2 μ L
ATP/ GTP/ UTP/ CTP	各 2 μ L
DNA 模板	0.5 μ g
T7 RNA Polymerase Enzyme Mix	2 μ L
RNase-free H ₂ O	Up to 20 μ L

37°C 孵育 2 h，之后在反应体系中加入 1 μ L DNase I，37°C 孵育 15min 将 DNA 模板消化，得到带 F2 标签的正义 RNA 和反义 RNA。

(3) 取 2 μ L RNA 检测浓度；取 1~2 μ L RNA 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量和长度；符合要求的 RNA 置于 -80°C 保存或直接用于后续实验。

* 注意：i. 由于 RNA 容易降解，最好在 RNA pull-down 实验当天或前一天进行体外转录实验。

ii. 当目标序列过短 (<300bp) 或过长 (>4kb) 时，探针制备难度将增加；长序列可以分段进行实验。

方案 2：体内 F2-RNA pull-down——RNA-F2 过表达细胞制备

(1) 根据目标 RNA 序列设计带 F2 标签序列 (GGCGCTGACAAAGCGCC) 的引物，扩增得到“F2-目标序列”，并构建至表达载体中。

* 注意：如果是 circRNA，请将 F2 标签序列分为两部分，分别连在 circRNA 接口处首尾（例如 AAAGCGCC 连在 circRNA 头部，GGCGCTGAC 连在 circRNA 尾部），并将此序列构建至 circRNA 表达载体中，只有当载体上的 circRNA 在细胞内首尾连接成环后，才能在接口处形成完整的 F2 标签，避免了线性序列的干扰。

(2) 表达载体转染目的细胞，细胞内会天然转录得到带 F2 标签的目标 RNA（对照用空载体表达细胞）。

V 操作方法

* 注意：

- 请务必使用无 RNase 的实验材料：如离心管、枪头等。
- 为保证磁珠均匀分布，请反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀瓶中磁珠。
- 具体样品量和孵育时间依赖于每个特定体系，可能需要优化才能得到最大产量。

5.1 样本裂解

(1) 按如下方法收集和处理样本：

样本类型	样本量/组	收集方法
动物细胞	1 \times 10 ⁷ ~ 2 \times 10 ⁷ 个	冷 PBS 漂洗 2~3 次，彻底去除培养基成分，4°C 500 g 离心 5 min 收集沉淀
动物组织	100~200 mg	冷 PBS (RNase-free) 清洗干净，彻底去除血液等成分，液氮充分研磨
植物组织	200~300 mg	RNase-free 水清洗干净，液氮充分研磨
微生物	50 μ L 菌体沉淀	冷 PBS 漂洗 2~3 次，彻底去除培养基成分，4°C 5000 g 离心 5 min 收集沉淀

- (2) 样本加入 300~500 μL 预冷的②裂解缓冲液、3~5 μL ⑦蛋白酶抑制剂（按 1:100 添加）和 1.5~2.5 μL ⑧RNA 酶抑制剂（按 1:200 添加），吹打混匀。
- (3) a. 动物细胞：置于冰上裂解 30 min（间隔手动混匀）；为了更充分裂解，也可以冰上超声至溶液基本澄清。
b. 动物组织：最好冰上超声破碎至溶液基本澄清，也可以置于冰上裂解 30 min（间隔手动混匀）。
c. 植物、微生物：冰上超声破碎至溶液基本澄清。
- (4) 4°C 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中；取 30 μL 作为 input，剩余用于 RNA pull-down 实验，-80°C 保存。

*** 注意：**当样本不能完全裂解时（溶液很浑浊），可以适当增加裂解缓冲液的用量继续裂解。根据经验，提取到的样本蛋白浓度通常不低于 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，总量约 2~3 mg。如果样本中目标蛋白丰度较低，或结合物间的结合较弱，也可以增加初始样本量以获得更多蛋白。300 μL 为裂解缓冲液的最小使用体积，当样本量增加时，裂解液缓冲液和抑制剂可等比例增加，但总孵育体积最大不超过离心管体积的 2/3。超声条件因样本类型和超声设备而异，可提前摸索好合适的条件。

5.2 F2 配体磁珠制备

- (1) 每组实验取 40 μL ①磁珠，加入 500 μL ③NT2 缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (2) 再次加入 500 μL ③NT2 缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (3) 加入 200 μL ③NT2 缓冲液，上下颠倒重悬磁珠。
- (4) 加入 20 μL ⑨F2 配体，混匀仪上室温孵育 30 min，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (5) 加入 500 μL ③NT2 缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；重复该漂洗操作一次。
- (6) 加入 300 μL ③NT2 缓冲液，上下颠倒重悬磁珠。

5.3 漂洗液准备

取出⑩10 mL 离心管（空管），按照下表所示，加入本次实验 2 组样本（实验组+对照组）所需的⑤漂洗液、⑦蛋白酶抑制剂（按 1:200 添加）和⑧RNase 抑制剂（按 1:2000 添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。

实验类型	⑤漂洗液	⑦蛋白酶抑制剂	⑧RNase 抑制剂
体外 F2-RNA pull-down	5 mL	25 μL	2.5 μL
体内 F2-RNA pull-down	3 mL	15 μL	1.5 μL

*** 注意：**如果有多组样本，按照实际使用量配置。

5.4 RNA pull-down

方案 1：体外 F2-RNA pull-down

- (1) 取 3 μg RNA 探针，95°C 变性 3 min，冰浴 1 min，短暂离心甩下管壁液体，向管中加入 50 μL ④RNA 结构缓冲液和 1 μL ⑧RNase 抑制剂，室温放置 30 min。
- (2) 将 RNA 探针加入磁珠（5.2 制备）中，放混匀仪上室温孵育 30 min；放磁力架上静置 1 min 并弃上清。

- (3) 加入 500 μ L 漂洗液 (5.3 配置), 颠倒混匀 30 次, 放磁力架上静置 1 min 并弃上清; 重复该漂洗操作一次。
- (4) 加入样本裂解液 (5.1 制备), 放混匀仪上 4 $^{\circ}$ C 孵育 2~4 h; 放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (5) 加入 500 μ L 漂洗液 (5.3 配置), 颠倒混匀 30 次, 放磁力架上静置 1 min 并弃上清; 重复该漂洗操作两次。
- (6) 加入 50 μ L ⑥洗脱缓冲液, 涡旋震荡 20 s, 放混匀仪上室温洗脱 10~15 min, 涡旋震荡 20 s。
- (7) 1000 g 离心 20 s, 放磁力架上静置 1 min, 收集上清至新的离心管中, -80 $^{\circ}$ C 保存, 或直接用于 Western-blot、银染 SDS-PAGE 或质谱实验。

* 注意: RNA pull-down 捕获的蛋白量通常较少, 因此 SDS-PAGE 建议用硝酸银染色而非考马斯亮蓝染色, 硝酸银染色步骤参考如下:

- (1) 固定: 30 min (乙醇: 乙酸: 水=4: 1: 5 体积比);
- (2) 敏化: 30 min (乙酸钠 10.2 g, 硫代硫酸钠 0.471 g, 乙醇 45 mL, 加水至 150 mL);
- (3) 水洗: 4 次, 每次 10 min;
- (4) 银染: 30 min (硝酸银 0.375 g, 加水至 150 mL);
- (5) 水洗: 2 次, 每次 40 s;
- (6) 显色: 显影至条带清楚 (碳酸钠 4.5 g, 72 μ L 甲醛, 加水至 180 mL);
- (7) 终止: 5 min (Na₂EDTA 2.19 g, 加水至 150 mL)。

方案 2: 体内 F2-RNA pull-down

- (1) 将样本裂解液 (5.1 制备) 加入磁珠 (5.2 制备) 中, 放混匀仪上 4 $^{\circ}$ C 孵育 2~4 h, 放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (2) 加入 500 μ L 漂洗液 (5.3 配置), 颠倒混匀 30 次, 放磁力架上静置 1 min 并弃上清; 重复该漂洗操作两次。
- (3) 加入 50 μ L ⑥洗脱缓冲液, 涡旋震荡 20 s, 放混匀仪上室温洗脱 10~15 min, 涡旋震荡 20 s。
- (4) 1000 g 离心 20 s, 放磁力架上静置 1 min, 收集上清至新的离心管中, -80 $^{\circ}$ C 保存, 或直接用于 Western-blot、SDS-PAGE 或质谱实验。

* 注意: RNA pull-down 捕获的蛋白量通常较少, 因此 SDS-PAGE 建议用硝酸银染色而非考马斯亮蓝染色, 硝酸银染色步骤详见方案 1。

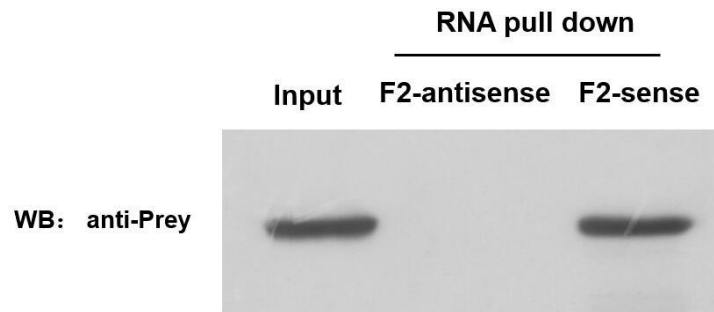
VI 问题解决

问题	可能原因	解决方案
获得的蛋白复合物少	样本蛋白量不够	提高样本用量
	孵育时间不够	延长孵育时间 (如孵育过夜), 但需要注意孵育时间过长也可能导致非特异性结合增多
	RNA 探针量不够	提高 RNA 探针用量
获得的复合物杂蛋白多	非特异性的蛋白结合在磁珠上	增加漂洗时间和次数, 或样本预处理: 先与磁珠孵育, 去除非特异结合蛋白

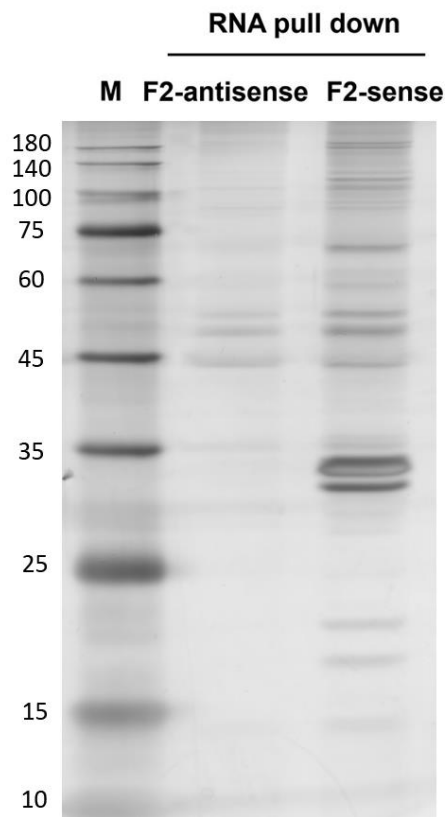
VII 使用案例

实验目标：检测目标 RNA 与待测蛋白（Prey）是否存在相互作用。

- (1) Input: 样本裂解液；
- (2) F2-antisense: F2-RNA 反义链探针的 pull-down 产物（对照组）；
- (3) F2-sense: F2-RNA 正义链探针的 pull-down 产物（实验组）。



待测蛋白的 RNA pull-down WB 检测图



RNA pull-down 蛋白银染图